中華農業研究 (Jour. agric. Res. China) 29(3)：203～210 (1980)

臺灣茄科植物青枯病菌菌體所含多醣類之氣液層次分析研究[1]

廖 英 明[2]

摘要：分析臺灣茄科植物青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) 16 個菌株細胞體多醣類，發現其組成變異性大。這 16 個菌株大致可區分爲五類，各類別間之區分甚爲明顯；菌株 70 及 81 號和其他菌株間之差異程度尤大。存在於細胞體多醣類之化學組成爲 L (+) 樹膠醛糖，α-D (+) 甘露糖，α 及 β 葡萄糖，β-一分解乳糖，氨基葡萄糖，L (+) 鼠李糖，β 一分解乳糖酸及一些未鑑定之單糖。在菌株 50 中，其 lipid A 所含之脂肪酸則以癸酸，棕櫚酸及花生油酸爲主，另含少量之其他脂肪酸。

臺灣茄科植物青枯病菌具有變異性 (1,2,10)，不同菌株間之差異性大，而且包括有數種病原型，生理性質之測定亦顯示其間有很大之差異，同時由脂肪酸組成的不同，也可將臺灣茄科植物青枯病菌區分爲數種類型，但這些類型與由病原型或其他生理性質所區分之類型不同 (1,10)。依照 Buddenhagen 及 Kelman 兩氏 (4,5) 之看法，在自然界存在的菌系有三種型式：(1) 只有在病原性上產生特化之菌系；(2) 除了在病原性上產生特化外，亦可以在一些其他的生理或形態之特性上產生特化之菌系，但這些生理或形態之特性和病原性有或無關；(3) 只有在細菌學的特性上產生特化之菌系。基於第二類存在的可能性，本研究即就細菌其本身之組成份來加以探討。在多醣類之抽取方法上，以前採用酒精沉澱法 (11)，但此種方法所得之多醣類往往雜有許多不純物質如蛋白質、核酸等，而干擾了分析結果。以酚一水層 (phenol-water) 方法，抽取多醣類可使不純物之含量減少到最低，由此在醣類之抽取及純化方面已有顯著之改善。更由於利用 Trimethylsilyl derivatives 來鑑定糖類及以吡啶 (pyridine) 當作溶劑之改進，使得醣類之氣液層次分析可以順利地進行 (6,15,20,22)。本研究亦將探討由細菌體多醣類之區分所得之菌系是否與其他方法所得者具有關聯存在。

材料與方法

一、供試菌之來源及細菌之培養：本研究所選用之 *Pseudomonas solanacearum* 16 個菌株均取自中興大學植病研究所細菌研究室所保存的細菌菌種。由保存細菌的有蓋試管中挑取部份細菌懸浮液在 TTC 培養基 (11) 平板上劃線培養，經 32°C，48 小時後，選取具有毒性流質狀之菌落，移殖於 Nutrient agar 斜面上。於 32°C 再經 24 小時之培養後，取一白金耳量之細菌移入 Husain 及 Kelman 培養基 (Ammonium sulfate 1.32g, Magnesium sulfate 0.08g, Zinc sulfate 8mg, Ferric chloride 2.5mg, Manganese sulfate 1.8mg, Sucrose 12g, Yeast extract 1.0g, Casein

---

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 937 號。本文部份爲作者之碩士論文，承中興大學植病研究所徐所長世典博士指導與斧正，謹此致謝。
2. 本所植物病理系技佐。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

hydrolyzate Difco 2.5 g, Phosphate buffer PH7.0 10ml, Distilled water 1,000ml) 中，於 28°C 振盪培養 3 天後，所得之培養液作爲分析用。

二、細菌體多醣類之抽取：多醣類以 phenol-water 方法抽取 [22]。將培養於 Husain 及 Kelm n 培養基中三天的細菌培養液以 10,000×g 離心 30 分鐘，使細菌沉澱。細菌並以氯化鈉飽和水溶液 (31.7 g/100 ml) 洗三次。洗過的濕細菌體 5 g，懸浮於三倍量 (15ml) 的 pH 7.0 之磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 中。細菌懸浮液再置於 sonifier cell disruptor (Model W 185, Heat System-ultrasonics, Inc. phainview, L. T., New York) 中經 80 Watts ，15 分鐘處理，使細菌體破裂。將此打碎之細菌體加熱至 65～68°C ，然後加入 65～68°C 之 45 %酚水溶液 (phenol-water) (W/V) 20 ml，在 65°C 抽取 30 分鐘，則混合液分爲三層：即水層、酚層及不可溶解層 (insoluble layer) 。取出水層保留；酚層則再以同樣方法抽取，所得之水層與第一次所得者混合 。將所收集之水層部份用 40 倍量蒸餾水透析一夜 。透析過之水層再以 10,000 Xg 離心 15 分鐘，將不可溶解部份去之 。可溶性部份則經眞空抽氣使之乾燥，如此所得之結晶體即爲粗製之 Lipopolysaccharide (LPS) 。

三、多醣類之純化：由於細菌體成份複雜，雖經酚類處理將大部份蛋白質去除，但仍混雜許多不純物，因此必須以下列方法加以純化。(一) 醋酸化作用：將粗製 LPS 5 mg 溶於 10 ml 之甲醯胺 (formamide) 中，振盪一夜後，加入吡啶 5.5 ml，隨即又在 20°C 下逐滴加入 3.7 ml 之無水醋酸 (Acetic anhydride) ，並且加以攪拌，如此可使醋酸化作用完全。將此反應混合液置於室溫振盪三天，而後倒入 100 ml 之甲醇 (Methanol) 中 (於 50～55°C) ，並靜置 2 小時，使多醣類沉澱，再經濾紙過濾，以收集多醣類。多醣類並用甲醇及乙醚洗滌，所得之多醣類陰乾後，再以上法重複一次。將陰乾後之多醣類以 10 ml 的氯仿抽取 ，而得氯仿可溶性部份。(二) 脫醋酸作用：將氯仿可溶性部份加入 4 ml 之 1 N 氫氧化鈉 (溶於乙醇) ，經 48 小時，取出過濾。過濾液經減壓濃縮得部份純化之 LPS (partially purified LPS) 。(三) 氯仿及甲醇之抽取：將氯仿及甲醇 (2 : 1 V/V) 混合液 5 ml 加入部份純化之 LPS 中。所得之二部份，即氯仿可溶性含游離脂質 (lipid) 部份，及氯仿不可溶性含純的多醣類部份。將多醣類部份經減壓抽氣使之乾燥。此二部份均分別打入氣液層次分析儀中。

四、氣液層次分析法：醣類本身並不具揮發性，因此在打入氣液層次分析儀前必須加以處理，使其改變結構而具揮發性 [13,20] 。處理方法如下：將醣類作成 100 mg/ml 之水溶液。取 0.5 ml 加入 0.25 ml 之 1 %肌糖 (inositol) 溶液。此液合液經減壓抽氣 (40°C) 10～15 分鐘，使之乾燥。乾燥後之醣類移入小玻璃管中，然後將此玻璃管置於氮氣流 (Nitrogen stream) 下，徐徐加入 Sigma-sil-A 試劑 (Trimethyl chorosilane : Hexamethyl disilazane : Pyridine=1 : 3 : 9) 0.1 ml。在溫室作用 10 分鐘後 (其間至少搖動 1 分鐘以上) ，即可得醣類之 TMS 衍生物 (derivatives) 。此種醣類衍生物具揮發性，可利用氣液層次分析儀分析。氣液層次分析儀 (Shimazu GC-5A) 內裝 H_2-flame ionization detector。使用之分離管爲外徑 0.3 cm，長 0.5 m 之玻璃管，內裝 6% QF-1 on 80～100 mesh chromosorb W 。分析條件爲 : 氣體流速 ，氮氣 : 氫氣 : 空氣 =37 : 40 : 400 (ml/min) ；分離管溫度首先在 110°C 恆溫 4 分鐘，而後以每分鐘 4°C 之速度直線升溫，至 210°C 時再維持恆溫，注射栓溫度爲 260°C，圖表速度 100 mm/min ；敏感度 10^2，範圍 32×0.01V，注射量爲 2 μl 。

結 果

一、多醣類之純化

茄科青枯病菌 16 個菌株之細菌體以 Sonicator ，經 80 Watts，15 分鐘之超音波振盪後，在顯微鏡下可見大部分細菌體已被震破，因此可將細胞壁及細菌體內 (少量) 之多醣類抽取出來。由於

細菌體抽取所得之多醣類雜夾許多不純物，其中以蛋白質所占比率爲最大，因此必須將它純化以避免分析時之干擾。本試驗多醣類之抽取過程中， LPS (Lipopolysaccharide) 經酚之抽取已將細菌體之蛋白質去除大部分。抽出物利用 Colorimeter 法 (14) 測得蛋白質含量在 1.6 %以下，而且經 Nihydrin test 結果爲負。抽出物經過醋酸化及氯仿之抽取亦已將大部分醣類及游離脂質去除。

二、青枯病菌各菌株間細胞體所含多醣類之比較

不同菌株在細胞體多醣類之組成份上有許多差別存在（表1），菌株 70 及 81 具有較多之單糖成份，而菌株 27 及 50 組成份則較爲簡單，根據細胞多醣類的不同可將16個菌株區分爲五種類別，每一類別所代表之菌株所形成的分析圖譜如圖1所示。大部分菌株所共有的爲尖峰 D (α- 葡萄糖)，尖峰 G (β-葡萄糖) 及尖峰 H （未鑑定化合物）。

三、菌株 50 其 Lipid A 所含脂肪酸之分析

當粗製之多醣類以甲醇：氯仿抽取時，所得之氯仿可溶性部分，即爲 lipid A 部分 (12) 。此部分之游離脂肪酸可經由 SE-30 column 分析出來（表2），由此結果顯示多醣類和許多脂肪酸結合在一起，其中以棕櫚油酸 (C16：1) ，癸酸 (C10) 及花生油酸 (C20) 的含量較多（圖2）

表 1. *Pseudomonas solanacearum* 16 個菌株細胞體多醣類酸化水解產物之比較 [a]

Table 1. Comparison of hydrolyzed products of lipopolyssaccharide from 16 isolates of *Pseudomonas solanacearum.*

類型 Type	尖峰代號 peak number [b]														包括菌株 Isolate included
	A	B	C	D	E	F	G	H	T	U	V	W	X	Y	
I	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	70 81
II	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	+	+	+	47
III	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	9 11 42 63 64 65 66 67 69 72
IV	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	50 27
V	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	21

a. 「+」表示存在，「−」表示不存在。

"+" indicates presence of the compound ; "−" indicates absence of the compound.

b. A 之持續時間爲 4.70 分（未鑑定化合物）， B 爲 12.8 分 (L-D(+) 樹膠醛糖)， C 爲 16.8分（(α−D (+) 甘露糖)，D 爲 18.8 分 (α−葡萄糖)， E 爲 19.9分 (β−分解乳糖)， F 爲 20.8 分 (氨基葡萄糖)， G 爲 22.0 分) (β−葡萄糖)，H 爲 20.8 分（未鑑定化合物）， X 爲 3.40 分（未鑑定化合物），T 爲 8.40 分（未鑑定化合物），W 爲 23.20 分 (α−D−分解乳糖酸)， U 爲 21.50 分（未鑑定化合物），V 爲 28.20 分（未鑑定化合物），Y 爲 4.0 分（鼠李糖）。

Retention time for A was 4.70 min (unidentified), B 12.8 min (D(+) arabinose), C 16.8min (α−D(+) mannose), D 18.8 min (α−glucose), E 19.9min (β−D(+) galactose), F 20.8 min (glucosamine), G 22.0min (β−glucose), H 30.8min (unidentified), X 3.40min (unidentified), T 8.4 min (unidentified), W 23.2 min (α−D−galacturonic acid), U 21.5 min (unidentified), V 28.2min (unidentified), and Y 4.0min (L(+) rhamnose).

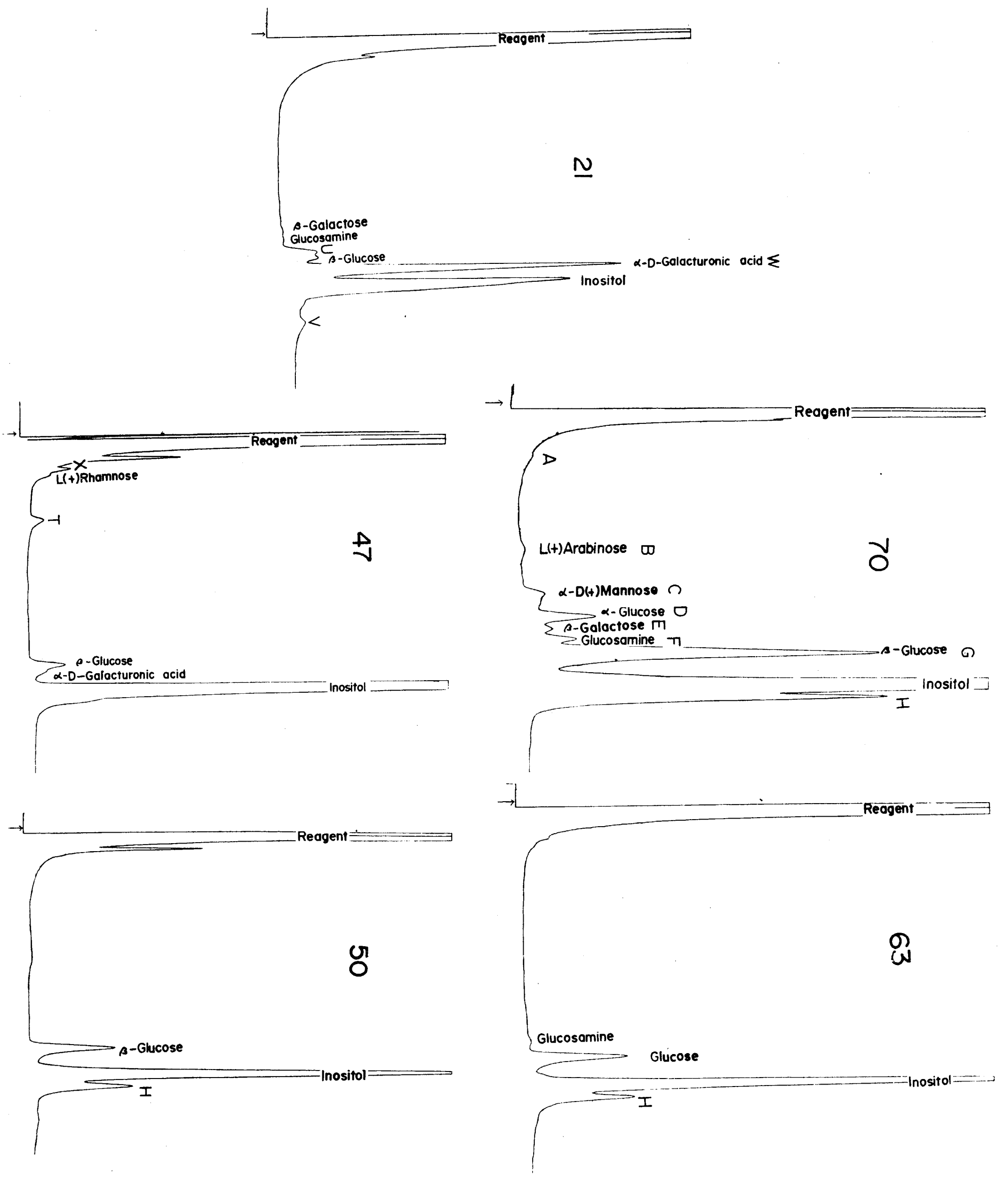

圖 1. *Pseudomonas solanacearum* 5個菌株體多醣類之氣液層次分析圖譜。圖中 Inositol 為內標準物質。

Fig 1. Gas chromatogram of lipopolysaccharides from 5 isolates of *Pseudomonas solanacearum*. Inositol was internal standard.

表 2. *Pseudomonas solanacearum* lipid A 所含之脂肪酸 [a]

Table 2. Fatty acids of lipid A from *Pseudomonas solanacearum*[a]

脂 肪 酸 Fatty acid	摩 爾 比 [b] Molar ratio(%)	持 續 時 間 (分) Retention time (min)
C 10 (癸酸)	29.6	8.8
C 14 (肉豆寇酸)	1.7	15.4
C 16 : 1 (棕櫚油酸)	54.8	17.2
C 16 (棕櫚酸)	0.7	18.3
C 18 : 2 (亞麻仁油酸)	0.9	20.8
C 20 (花生油酸)	9.1	22.4
C 22 (榆樹酸)	3.2	24.7

a. 此爲菌株 50 lipid A 所含之游離脂肪酸。 The fatty acids were derived from lipid A of isolate 50.

b. 少數量極少而未知的酸類未計算在內。 Some unidentified compounds were not included.

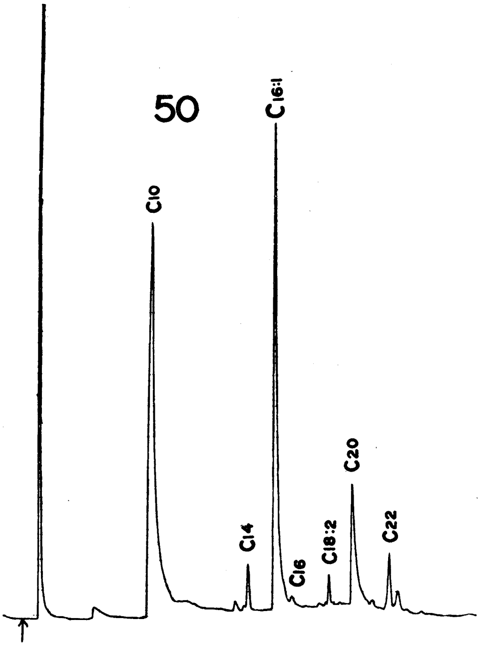

圖 2. *Pseudomonas solanacearum* (菌株 50) lipid A 所含游離脂肪酸之氣液層次分析圖譜。C 10 爲癸酸，C 14 爲肉豆寇酸，C 16 : 1 爲棕櫚油酸，C 16 爲棕櫚酸，C 18 : 2，爲亞麻仁油酸，C 20 爲花生油酸，C 22 爲榆樹酸。

Fig. 2. Gas chromatogram of fatty acids of lipid A from isolate 50 of *Pseudomonas solanacearum*. C 10 was capric acid, C 14 myristic acid, C 16 : 1 palmitolic acid, C 16 palmitic acid, C 18 : 2 linoleic acid, C 20 arachidic acid, C 22 behenic acid.

討 論

不同類型的菌株產生不同的尖峰，由尖峰的不同（細菌體本身所含多醣類之水解產物），可以明確的將各類型的菌株加以區別[18,19]，不同菌株間在細胞體多醣類的組成上的差異大（表 1）。Tsang (21) 謂以熱的 45 % phenol 水溶液抽取整個細菌細胞，可將脂多醣類 (Lipopoly saccharide) 分離出來，基於此，本實驗再經過 Westphal 氏(22)的方法而將 lipopolysaccharide 純化，使分析順利進行。存在於其他細菌體的多醣類組成以葡萄糖 (glucose)，分解乳糖 (galact ose) 及氨基葡萄糖 (glucosamine) 爲主[3,7,9,16,17,23,24]；本實驗顯示茄科植物青枯病菌大部分菌株細胞體多醣類所共有的組成以葡萄糖，分解乳糖酸 (galacturonic acid)，氨基葡萄糖，及尖峰 H 爲主。在 lipid A所含脂肪酸方面，則以癸酸 (capric acid)，棕櫚油酸 (palmitolic acid)，花生油酸 (arachidic acid) 爲主，與 Jenning (12) 分析 *Nesseria* sp. 之 lipid A 所含之 β-hydroxylauric acid 及 β-hydroxymyristic acid 不同。Swelley (20) 稱 TMS derivatives 在吡啶 (pyridine) 中於極短時間內可形成，因此在短時間內必須完成分析，否則無法得到分析結果；此點在實驗方法上必須考慮。

由本實驗採用的區分方法所得的結果與其他區分方法不同[1,2,8,10]，由此可知，本菌之變異性極大，但 *P. solanacearum* 是一複合的種類，由許多的菌系組成，其演變過程中，同一生化型的族羣，可能已分化爲病原性不同的族羣，或原屬同一病原型的族羣可能已分化爲病原性不同的族羣，但仍不失其原有的病原特性。

引 用 文 獻

1. 徐世典・1974・臺灣茄科青枯病病原細菌之菌系及其分佈之研究。Proc. Nat'l. Sci. council No. part 2：351-362.
2. 廖英明・徐世典・1978・氣液層次分析法分析茄科植物青枯病菌所形成之脂肪酸。國立中興大學植物病理學學報 7：11～19。
3. Adams, G. A., C. Quadling and M. Yaguchi. 1970. The chemical composition of cell-wall lipopoly-saccharides from *Moraxella duplex* and *Micrococcus caloaceticus.* Can. J. Microbiol. 16：1-8.
4. Budderhagen, I. W., Sequerra and A. Kelman. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum* . Phytopathology 52：726 (Abstr.)
5. Budderhagen, I. W. and A. Kelman, 1964. Biological and physiological aspects of bacteria wilt caused by *Pseudomonas solanacearum.* Ann. Rev. phytopathol. 2：203-230.
6. Cirillo, V. J. 1973. The history of gas-chromatography. J. chromatogr. 81：197-205.
7. Dmitriev, B. A., N. A. Hinton, R. W. Lowe and J. K. N. Jones, 1971. Studies on lipopolysaccharide of *Proteus.* Can. J. Microbiol. 17：1385-1394.
8. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum.* J. Appl. Bact. 27 (2)：265-277.
9. Henis, Y., J. R. Gould and M. Alexander. 1966. Eetection and identification of bacteria by gas chromatography. Appl. Microbiol. 14：513-524.
10. Hsu, S. T. and J. Y. chen. 1977. Physiological variation among isolates of *Pseudomonas solanacearum* from Taiwan. Pl. Protect. Bull. 19：124-132.
11. Husain, A. and A. Kelman. 1958. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* Phytopathology 48：155-165.
12. Jennings, H. J., G. B. Hawes and G. A. Adams. 1973. The chemical composition and serological

reactions of lipopolysaccharides from serogroups A. B. X and Y. *Nesseria meningtidis.* Can. J. Biochem. 51 : 1347–1354.

13. Lpisky, S. R. and R. A. Landowne. 1960. Gas chromatography-biochemical application. Ann. Rev. Biochem. 29–668.
14. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol . Chem. 193 : 265–275.
15. Mason, B. S. and H. T. Slover. 1971. A gas chromatographic method for the determination of sugars in foods J. Agar. Foodchem. 19 : 551–554.
16. Mongillo, A., K. Deloge, D. Pereira and G . P. O'Leary. 1974. Lipopolysaccharide from a gram-negative marine bacterium. J. Bacteriol. 117 : 327–323.
17. Osborn, M. J., S. M. Rothfield, L. D. Zeleznick and B. L. Horecker. 1964. Lipoplysaccharide of the Gram-negative cell-wall. Science 145 : 783–789.
18. Reiner, E. 1967. Studies on differentiation of microorganisms by Pyrolysis-gas-liquid chromatography. J. Gas Chromatogr. 5 : 65–67.
19. Reiner, E., J. J. Hicks. M. M. Ball and W. J. Martin. 1972. Rapid characterization of *Salmonella* organisms by means of pyrolysis-gas liquid chromatography. Anal. chem, 44 : 1058–1061.
20. Swelly, C. C., R. Bentley, M. Mamita and W. Wells. 1963. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. J. Am. Oil Chem. Soc. 85 : 2497–2507.
21. Tsang, J. C., C. S. Wang and P. Alaupovic. 1974. Degradative effect of phenol on endotoxin and lipopolysaccharide preparaions from *Serratia marcessens.* J. Bacteriol. 117 : 787–795.
22. Westphal, O. and K. Jann. 1965. Bacterial lipopolysaccharides : Extraction with phenol-water and further application of the procedure. In methods in Carbohydrate chemistry. Vol 5. : 83–91. Edited by R. L. Whistler. Academic Press. Inc. New York.
23. Williams, K. M. and B. Halpern. 1973. The use of gas chromatography-mass spectrometry for the diagonosis and study of metabolic disorders. Aust. J. Biol. Sci. 26 : 831–837.
24. Wurst, M., V. Vancura and L. Kalachova. 1974. Analysis of the polysacchariside of some soil by gas chromatography. J. chromatogr. 91 : 469–474.

Analysis of the polysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* from Taiwan by gas-liquid chromatography[1]

Ying-ming Liao[2]

Summary

Analysis of cellular polysaccharides mostly derived from cell wall shown that 16 isolates of *Pseudomonas solanacearum* varied greatly in their components of the polysaccharide, and they could be divided into 5 types. The composition of cellular polysaccharides found in *P. solanacearum* were L (+) arabinose, L-D (+) mannose, α and β-glucose, β-galactose, glucosamine, L (+) rhamnose, L-galacturonic acid, and other unidentified components. Fatty acids obtained from lipid A of isolate 50 including saturated and unsaturated acids, the main fatty acids capric acid, palmitic acid, arachidic acid, and trace of other fatty acids.

1. Contribution No. 937 from the Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Research Assistant, Department of Plant Pathology, TARI. Wufeng, Taichung Hsein, Taiwan 431, ROC.